

XP-002319523

(C) WPI/Derwent

AN - 1995-047902 [07]  
AP - JP19930140069 19930519; [Previous Publ. JP6327481 ]  
CPY - ASAG  
DC - B04 C06 D16  
FS - CPI  
IC - C07K13/00 ; C07K14/39 ; C12N1/19 ; C12N1/21 ; C12N15/09 ; C12N15/31 ;  
C12P21/02  
MC - B04-E01 B04-E08 B04-H06 B04-N04 B12-K04 B14-B06 C04-E02C C04-E02F  
D05-H12A D05-H12E D05-H17A  
M1 - [01] M423 M710 M903 P831 Q233 V753  
- [02] M423 M720 M903 N135 Q233 V901 V902  
PA - (ASAG ) ASAHI GLASS CO LTD  
PN - JP3508157B2 B2 20040322 DW200421 C12N15/09 008pp  
- JP6327481 A 19941129 DW199507 C12N15/31 008pp  
PR - JP19930140069 19930519  
XA - C1995-021273  
XIC - C07K-013/00 ; C07K-014/39 ; C12N-001/19 ; C12N-001/21 ; C12N-015/09 ;  
C12N-015/31 ; C12P-021/02 ; (C12N-015/31 C12R-001/645) ; (C12N-001/19  
C12R-001/645) ; (C12N-001/21 C12R-001/19) ; (C12P-021/02 C12R-001/645)  
; (C12P-021/02 C12R-001/19)  
AB - J06327481 A gene coding for a precursor of mating pheromone, P-factor,  
of fission yeast Schizosaccharomyces pombe, partic. having 606pb  
sequence given in the specification (and encoding the 201AA sequence,  
also given) is new. Also claimed are: (1) plasmids contg. the gene and  
(2) an expression controlling gene coding for the mating pheromone  
P-factor of S.pombe partic. having 847 DNA base.  
- USE/ADVANTAGE - The DNA is useful for elucidation and pass prodn. of  
conjugate pheromone, P-factor, for the prodn. of useful proteins.  
- The following steps are performed to prepare mating pheromone P-factor  
peptide: (a) Isolation of non-conjugate strain by culture of fission  
yeast homothallic strain JY450 and JY476 in the presence of  
nitrosoguanidine and Isolation of the desired mutant strain having  
map2 gene. (b) Isolating and identification of gene sequence of map2.  
(c) Expression of map2 gene in integrated plasmid pAMDP2. The spore  
formation rate of the plasmid pADMP2 was 5.4-5.8, while control gp.  
without integration showed corresponding rate of less than  
0.1.(Dwg.0/-)  
C - C12N15/31 C12R1/645  
- C12N1/19 C12R1/645  
- C12N1/21 C12R1/19  
- C12P21/02 C12R1/645  
- C12P21/02 C12R1/19  
IW - SCHIZOSACCHAROMYCES MATE PHEROMONE P FACTOR GENE PLASMID PRODUCE  
USEFUL PROTEIN  
IKW - SCHIZOSACCHAROMYCES MATE PHEROMONE P FACTOR GENE PLASMID PRODUCE  
USEFUL PROTEIN  
NC - 001  
OPD - 1993-05-19  
ORD - 1994-11-29  
PAW - (ASAG ) ASAHI GLASS CO LTD  
TI - Schizosaccharomyces pombe mating pheromone P-factor gene - also  
plasmids, for prodn. of useful proteins

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-327481

(43) 公開日 平成6年(1994)11月29日

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
C 1 2 N 15/31 Z N A  
1/19 7236-4B  
1/21 7236-4B  
// C 0 7 K 13/00 8318-4H  
9050-4B C 1 2 N 15/ 00 A  
審査請求 未請求 請求項の数 8 F D (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-140069

(22) 出願日 平成5年(1993)5月19日

(71) 出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72) 発明者 今井 義幸

愛知県岡崎市明大寺町字荒井12番地-2

(72) 発明者 山本 正幸

神奈川県相模原市上鶴間1-24-11

(72) 発明者 浜 祐子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 泉名 謙治

(54) 【発明の名称】 分裂酵母接合フェロモン前駆体遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子 DNA の提供。

【構成】 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子 DNA、および対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分裂酵母*S. pombe* の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子DNA。

\* 【請求項2】 下記DNA塩基配列で表される、分裂酵母*S. pombe* の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子DNA。

```

ATGAAGATCA CCGCTGTCAT TGCCCTTTTA TTCTCACTTG CTGCTGCCTC ACCTATTCCA 60
GTTGCCGATC CTGGTGTGGT TTCAGTTAGC AAGTCATAAG CTGATTTCCT TCGTGTTTAC 120
CAAAGTTGGA ACACTTTTGC TAATCCTGAT AGACCCAAC TGA AAAAGCG CGAATTCGAA 180
GCTGCTCCCG CAAAACTTA TGCTGATTTC TTCTGTGCTT ATCAAAGITG GAACACTTTT 240
GTTAATCCTG ACAGACCCAA TTGAAAAAG CGTGAGTTTG AAGCTGCCCC AGAGAAGAGT 300
TATGCTGATT TCCTTCGTGC TTACCATAGT TGGAACACTT TTGTTAATCC TGACAGACCC 360
AACTTGAAAA AGCGCGAATT CGAAGCTGCT CCCGCAAAAA CTTATGCTGA TTTCTTTCGT 420
GCTTACCAAA GTTGAACAC TTTTGTTAAT CCTGACAGAC CCAACTTGAA AAAGCGCACT 480
GAAGAAGATG AAGAGAATGA GGAAGAGGAT GAAGAATACT ATCGCTTTCT TCAGTTTAT 540
ATCATGACTG TCOCAGAGAA TTCCACTATT ACAGATGTCA ATATTACTGC CAAATTGAG 600
AGCTAA 606

```

【請求項3】 下記アミノ酸配列で表されるポリペプチド ※アクター前駆体。  
 からなる、分裂酵母*S. pombe* の接合フェロモン・P-ファクター

```

Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala 16
Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser 32
Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn 48
Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala Pro Ala 64
Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe 80
Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala 96
Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser Trp Asn 112
Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu 128
Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser 144
Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Thr 160
Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe 176
Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile Thr Asp 192
Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser 201

```

【請求項4】 請求項1または2の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。 30★【請求項6】 下記アミノ酸配列で表されるポリペプチド  
 からなる、分裂酵母*S. pombe* の接合フェロモンの分泌シグナル。

【請求項5】 請求項4の組換えプラスミドにより形質転換された酵母または大腸菌。

```

Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala 16
Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser 32
Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn 48
Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala Pro Ala 64
Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe 80
Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala 96
Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser Trp Asn 112
Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu 128
Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser 144
Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Thr 160
Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe 176
Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile Thr Asp 192
Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser 201

```

【請求項7】 分裂酵母*S. pombe* の接合フェロモンの発現制御遺伝子をコードする遺伝子DNA。 *S. pombe* の接合フェロモンの発現制御遺伝子をコードする遺伝子DNA。

【請求項8】 下記DNA塩基配列で表される、分裂酵母

```

ACTAGTCGGA GGGGAACGGG TATTTGTTTA TTCTCTCTT TTTTGGGTGC TCCATCTCCT 60

```

3

4

TTGAAGCTCT ATTTTAGTTG CTTTGCAGTA TCTATATCTG CTACAAGTAG CCAGAGGCGT 120  
TCTATGCCTT CAATCTGAAG TTCAATTTTTT CATTCTATGG CGGTATGCTA TTGGTTGAGT 180  
ACACACAAAG AACAAATGGAT AGAGTTTTAT TGTTTACATT ATCAAAAAAC CTTTAACCAA 240  
TAAAAAAAT AGCCGCTACC AGAAAAAGT CGCTTAAAT TAATAAGTCT TTTGATTGGT 300  
CGCTGTACAT AGAAGTTCAT TTTGGGTGGA CGACAAAAA ATAAGCGAAT ATCTTCAACC 360  
AATCAGGATA AACAGCGATA AAACGAAAAA GGGGAAGTCA TTAATAAATG GCGGTTAATG 420  
TCAACAATGA ACAGTTTGAA AGCATAGAAT TCCAGATTG AATTGAGGGA AACGGAGCAC 480  
TACAAAGATG TATAAATACA GGCATTCTGT CCCAGAAGAA AACCGAATT CGTTCAAGTC 540  
TTCTATTTTA CATATTCACCT CTTTCTATTT CTTATTCTTC ACTCTACAAG AACTCGCGTT 600  
GGGTGTGAAT TTACATCCCT CTTGTCAACA AACCTGCTCC GTTAGCTAAT TTTCTGTAAG 660  
TTTGCTTCGA TCTTTCTTAT TCTAATCTTT TAATCTTTT TCTTTTGAA TTTTGCCTTT 720  
TTAACTCTC CCTTTTTTGG AATCAGTCAA CAAATTATAA TTTTCTTCTT TTAATTGCTA 780  
GTTTCATCGCT TAAACTATCT TTCTTTTCT AACTTATCAA CGAAATTTTA TTTTTCAC 840  
ATACATT 847

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は分裂酵母*S. pombe*の接合に関与する接合フェロモン（P-ファクター）の構造遺伝子およびその調節領域遺伝子、接合フェロモン遺伝子を組込んだ組換えプラスミド、ならびにその利用に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】分裂酵母シゾサッカロミセス ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）は単細胞真核生物として広く研究されている。通常の栄養条件では、1倍体として生育しているが、栄養飢餓の条件で接合および胞子形成を行うようになる。接合を行う際には、2種類の接合型（ $h^+$ と $h^-$ ）を示し、相互に接合を行うことで、接合子（ $h^+/h^-$ ）を形成する。接合子は直ちに減数分裂および胞子形成を行うが、接合が起こった後すぐに栄養豊富な培地に移されると、2倍体として栄養増殖を開始することができる。従って、分裂酵母*S. pombe*は、1倍体および2倍体として生育することが可能である。

【0003】接合の制御は分裂酵母の分泌する接合フェロモンによって制御されていることが知られている。2種類の接合型のうち、 $h^+$ 細胞はP-ファクター、 $h^-$ 細胞はM-ファクターと呼ばれる接合フェロモンを分泌している。

【0004】サッカロミセス セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）においても類似した機構が働いており、フェロモンの同定が行われている。分裂酵母のP-ファクターはサッカロミセスセレビスエの $\alpha$ -ファクター、M-ファクターは $\alpha$ -ファクターに対応すると考えられる。M-ファクターについては近年その分子の実体が明らかになった。M-ファクターは9アミノ酸からなるペプチドであり、C末端がファルネシル化されていることが示されており、サッカロミセスセレビスエの $\alpha$ -ファクターと近い構造を有する。これに対して、P-ファクターについても実体はこれまで明らかになっていない。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】これまで出芽酵母サッカロミセスセレビスエにおいては接合フェロモン（ $\alpha$ -ファクターならびに $\alpha$ -ファクター）の分子の実体が明らかになっている（Cell (1982) 30, 933-943, J. Kurjan and I. Herskowitzなど）。これに対して分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモンについての研究は遅れていた。

【0006】 $h^-$ 細胞の作るM-ファクターについては、9アミノ酸からなるペプチドであることが近年明らかにされた（J. Davey, EMBO J. 11, 951-960 (1992)）のに対して、 $h^+$ 細胞の分泌するP-ファクターについてはその分子の実体が明らかになっていなかった。本発明は、分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモンの実体を明らかにしようとするものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は従来その実体が不明であったP-ファクターの分子の実体を明らかにするとともに、P-ファクターを大量に入手することを可能とした。また、分裂酵母*S. pombe*において機能する分泌シグナルペプチドを明らかにしたことより、分裂酵母*S. pombe*に適したベクター系との組み合わせにより有用な蛋白質の分泌生産を可能とする。本発明の遺伝子およびポリペプチドは分裂酵母の接合および胞子形成を制御するために重要な物質であり、応用面においても重要性が高い。

【0008】本発明は、この分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子DNA、後記DNA塩基配列で表されるこの遺伝子DNA、およびこの遺伝子がコードするアミノ酸配列を有するポリペプチドである。さらに本発明は、この遺伝子を有する組換えプラスミド、およびそれにより形質転換された酵母または大腸菌である。

【0009】本発明者は、次に示す方法で、分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモン（P-ファクター）の前駆体遺伝子を見出し、その構造を決定した。

【0010】（1）分裂酵母にニトロソグアニジンによ

り突然変異を誘発させ、接合不能型の変異株を選択する。

(2) 変異株の接合不能変異についての遺伝子解析を行い、P-ファクターの生産に関与している遺伝子の同定を行う。

(3) 解析したそれぞれの接合不能変異株を分裂酵母の遺伝子ライブラリーにより形質転換し、機能を相補する遺伝子を同定する。

(4) 同定した遺伝子の配列を決定する。

【0011】(5) 1倍体を用いて、同定した遺伝子の破壊を行い、表現型を調べ、接合不能性を示すかを確認、目的の遺伝子であることを検定する。

(6) 同定した遺伝子を分裂酵母での発現に適したベクター系に組み込み、遺伝子産物を酵母内で強制発現させ、その機能を検定する。

以上の方法により、P-ファクターをコードする遺伝子を同定することができ、その構造が決定された。

(8) 同定した遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列を持つポリペプチドを合成し、P-ファクターとしての活性を示すかを直接的に確認する。

【0012】以上の方法によって、分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモンP-ファクター前駆体遺伝子を見出し、その構造が決定された。また、予想されるアミノ酸\*

\*配列より接合フェロモンP-ファクターポリペプチドを合成した。

【0013】以下上記過程とそれによる本発明を実施例により具体的に説明が、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0014】

【実施例】

【実施例1】

接合型特異的接合不能変異株の単離

【0015】分裂酵母ホモトリック株JY450およびJY476をYPD培地にて培養、集菌後ニトロソグアニジンを用いて最終濃度50、200 および 500  $\mu\text{g/ml}$ で突然変異を誘発した。

【0016】80,000コロニーのスクリーニングから725株の接合不能変異株が得られた。さらに $h^+$ 型株または $h^-$ 型株との交配により接合型特異性を調べた。得られた「接合型特異的な接合不能変異株の表現型」のデータを表1にまとめた。

【0017】これらのうち、map2遺伝子変異株はP-ファクターの分泌をせず、map2遺伝子はP-ファクターの前駆体をコードしていると考えられた。

【0018】

【表1】

遺伝子座	独立な突然変異株の数	孢子形成能	Pファクターの分泌	Mファクターの分泌	性的凝集能
map1	15	-	-		-
map2	3	+	-		+
map3	10	+	+		+
map4	4	+	+		-
man1	15	+		-	-
man2	6	+		+	+
man3	4	+		+	-
man4	3	±		-	-

【0019】【実施例2】

map2遺伝子の単離および構造解析

【0020】分裂酵母のゲノムDNAライブラリーを以下のように作製した。分裂酵母JY939より調製したゲノムDNAをSau3AIで部分分解し、アガロースゲル電気泳動した。6.0-9.5 および9.5-15kbのDNA断片を回収しこれを、シャトルベクターpDB248をBamHIで消化しアルカリファスファテースにて処理したものとライゲーション(Ligation)し、大腸菌を形質転換した。その結果6.0-9.5kb DNAのものに対しては3500クローン、9.5-15kbのものに対しては約1000クローンの独立な形質転換体を得られた。

【0021】map2変異株のうち、map2-621変異株を上記

のように作製した分裂酵母遺伝子ライブラリーにて形質転換し、ヨウ素蒸気でコロニーを染色、茶褐色に染色されたコロニー中の菌体を顕微鏡観察し、接合型子嚢を形成しているものを選択した。接合型子嚢を形成した形質転換体より調製したDNAを用いて、大腸菌BB101形質転換し、アンピシリン耐性体を得た。このようにして、変異株の形質を相補できる遺伝子を単離することが可能であった。そこで、アンピシリン耐性株よりプラスミドDNAを調製し、その構造を解析した。

【0022】得られたプラスミドについては、再度分裂酵母変異株を形質転換し、変異を相補できるものについて解析を継続した。

【0023】得られたmap2遺伝子の遺伝子配列はシーク

エナーゼを用いたジデオキシ法によって決定した。DNA断片をpUC118、pUC119、pBluescript-KS+ またはpBluescript-SK+ にサブクローンしエキソヌクレアーゼおよびS1ヌクレアーゼを用いて一方方向性にDNAを削つ\*

\*た。ヘルパーファージを用いて一本鎖DNAを調製し鋳型DNAとした。シークエナーゼを用いたジデオキシ法によって塩基配列を決定した。その結果を以下に示す。

【0024】

```

ACTAGTCGGA GGGGAACGGG TATTGTGTTA TTCTCCTCTT TTTGCGTGC TCCATCTCCT 60
TTGAAGCTCT ATTTTAGTTG CTTTGCAGTA TCTATATCTG CTACAAGTAG CCAGAGGCGT 120
TCTATGCCCT CAATCTGAAG TTCATTTTTT CATTCTATGG CGGTATGCTA TTGGTTGAGT 180
ACACACAAAG AACAAATGGAT AGAGTTTTAT TGTTTACATT ATCAAAAAAC CTTTAACCAA 240
TAAAAAAAT AGCCGCTACC AGAAAAAAGT CGCTTAAAT TAATAAGTCT TTTGATTGGT 300
CGCTGTACAT AGAAGTTCAT TTTGGGTGGA CGACAAAAAA ATAAGCGAAT ATCTTCAACC 360
AATCAGGATA AACAGCGATA AAACGAAAAA GGGGAAGTCA TAAAAAATG GCGTTAATG 420
TCAACAATGA ACAGTTTGAA AGCATAGAAT TCCAGATTGG AATTGAGGGA AACGGAGCAC 480
TACAAAGATG TATAAATACA GGCATTCTGT CCCAGAAGAA AACAGAATT CGTTCAAGTC 540
TTCTATTTTA CATATTCACT CTTTCTATTT CTIATTCTTC ACTCTACAAG AACTCGCGTT 600
GGGTGTGAAT TTACATCCCT CTTGTCAACA AACCTGCTCC GTTAGCTAAT TTTCTGTAAA 660
TTTGCTTCGA TCTTTCTTAT TCTAATCTTT TAATCCTTTT TCTTTTGAA TTTTGCTTTT 720
TTAAACTCTC CCTTTTTTTG AATCAGTCAA CAAATTATA TTTTCTTCTT TTATTGCTA 780
GTTTCATCGT TAAACTATCT TTTCTTTTCT AACTTATCAA CGAAATTTTA TTTTTCAC 840
ATACATTATG AAGATCACCG CTGTCATTGC CCTTTTATTC TCACITGCTG CTGCCTCACC 900
TATTCCAGTT GCGATCCCTG GTGTGGTTTC AGTTAGCAAG TCATATGCTG ATTTCTTCG 960
TGTTTACCAA AGTTGAACA CTTTGCTAA TCCTGATAGA CCCAACTTGA AAAAGCGCGA 1020
ATTGGAAGCT GCTCCCGCAA AAACCTATGC TGATTTCCTT CGTGCTTATC AAAGTTGGAA 1080
CACTTTTGTT AATCCTGACA GACCCAATT GAAAAAGCGT GAGTTTGAAG CTGCCCCAGA 1140
GAAGAGTTAT GCTGATTGCC TTCGTGCTTA CCATAGTTGG AACACTTTTG TTAATCTGA 1200
CAGACCAAC TTGAAAAAGC GCGAATTCGA AGCTGCTCCC GCAAAAACTT ATGCTGATT 1260
CCTTCGTGCT TACCAAGATT GGAACACTTT TGTTAATCCT GACAGACCA ACTTGAAAAA 1320
GCGCACTGAA GAAGATGAAG AGAATGAGGA AGAGGATGAA GAATACTATC GCTTTCTTCA 1380
GTTTTATATC ATGACTGTCC CAGAGAATTC CACTATTACA GATGTCAATA TTAGTGCCAA 1440
ATTTGAGAGC TAAACTCAT TTATCTTCAT ATTTTTTTTA TTTTCTAGTA TGTAGCCCA 1500
CACATCTTTA CAAAGCCATG TGAAGCAATT TTTAAATTA ATTGCTATTT TCGATCTATT 1560
ATTTTACCAT ACGATCTGTA TTCCTATTCG CAATAATATT TTTAATTTTC ATCTTAGTCT 1620
TCATATTGTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GAAAAAACGT ATAGTAGTTA 1680
CAATATTACT GAAATCTACA GTACT 1705

```

【0025】map2遺伝子産物のアミノ末端附近にはシグナル配列と考えられる疎水性領域が存在し、アスパラギン結合型糖鎖付加可能部位が2カ所存在した。また、34アミノ酸からなる4回の繰返し構造が認められ、パン酵母αファクター遺伝子の構造と類似していた。map2に相補的な遺伝子が分裂酵母に他にも存在するかを調べたが、見い出されなかった。なお、上記DNA塩基配列の1番から847番までは、分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモンの発現制御遺伝子をコードする遺伝子DNAで

ある。

【0026】上記DNA塩基配列の848番から1453番までは分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモン・P-ファクター前駆体をコードする遺伝子DNAであり、その配列より接合フェロモン・P-ファクター前駆体のアミノ酸配列は次の通りである。このポリペプチドはまた分裂酵母*S. pombe*の接合フェロモンの分泌シグナルペプチドであると考えられる。

【0027】

```

Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala Ala Ala 16
Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Lys Ser 32
Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe Ala Asn 48
Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala Pro Ala 64
Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe 80
Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala 96
Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser Trp Asn 112
Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu 128

```

9

10

Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser 144  
 Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Thr 160  
 Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe 176  
 Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile Thr Asp 192  
 Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser 201

【0028】図1と図2にmap2遺伝子産物の構造上の特徴を示す。図1にmap2遺伝子産物に見られる繰り返し構造を示す。map2遺伝子産物に4回現れる34アミノ酸の繰り返しを示した。図2にmap2遺伝子産物の疎水性領域と親水性領域を示す。kiteらの方法(J.Mol.Biol.157,105-132(1982))により、疎水性の領域が+で表されている。ウインドウ(window)は6アミノ酸とした。

【0029】【実施例3】

map2遺伝子の破壊

【0030】クローン化したmap2のオープンリーディングフレームから0.45kbの断片を除去し、さらに分裂酵母のura4遺伝子を挿入した断片を作製、直鎖状にした後、分裂酵母を形質転換した。得られた遺伝子破壊株はオリジナルな酵母と同じ表現型を示した。また、遺伝子破壊株とオリジナルな株を交配し、500以上の子孫細胞の表現型を調べたところ、いずれの場合も、すべて接合不能であった。遺伝子の置換が正確に行われているどうかはゲノムDNAのサザン分析によって確認した。以上の結果から、クローン化された遺伝子は実際にmap2であることが証明された。

【0031】【実施例4】

map2遺伝子の強制発現

【0032】map2遺伝子のオープンリーディングフレームを含む0.8kbのDraI断片をベクターpART1のSmaI切断部位に挿入した。ベクターのadhプロモーターと同一方向にmap2遺伝子が挿入されたプラスミドpADMP2を選択した。

【0033】map1変異株あるいはmat1-Pc変異をホモに持つ2倍体株は孢子形成不能であるが、P-ファクターを与えると孢子形成が可能である。そこで、上記プラスミドをmap1/map1に導入した。その結果、map2遺伝子の強制発現が起こり、map1/map1変異株の孢子形成頻度が顕著に増大した。その結果を表2に示す。表2は「map2遺伝子の強制発現によるmap1変異株の孢子形成能の回復」を示すデータである。これらの結果は、pADMP2を含む酵母株はP-ファクターを大量発現した結果、孢子形成が可能になったものと考えられた。

【0034】

【表2】

プラスミド	遺伝子	孢子形成率(%)	
		SSA	SPA
pADMP2	map2	5.4	5.8
pART1		< 0.1	< 0.1

【0035】【実施例5】

接合フェロモンP-ファクターポリペプチドの合成

【0036】アミノ酸配列[Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn ThrPhe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu]で表されるポリペプチドをMerrifieldの固相合成法により自動合成した。ついで、合成ペプチド粗分画を高速液体クロマトグラフィーにて下記条件で精製した。

カラム：ウォータースC18カラム（マイクロボンダスフェアC18カラム）

溶出液A：0.1%TFAを含む水、溶出液B：0.1%TFAを含むアセトニトリル

カラムに粗ペプチド分画をチャージ後、溶出液Bの濃度を60%になるまで直線濃度勾配をかけ、ペプチドを溶出した。一部を分析用カラムで解析したところ、95%以上の純度を示した。

【0037】

【発明の効果】従来その実体が不明であったP-ファクターの分子実体を明らかにするとともに、P-ファクターを大量に入手することが可能となった。また、分裂酵母S.pombeにおいて機能する分泌シグナルペプチドを明らかにしたことより、分裂酵母S.pombeに適したベクター系との組み合わせにより有用な蛋白質の分泌生産を可能になった。

【0038】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1705

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：シノサッカロミセス ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)

株名：JY939

配列

ACTAGTCGGA GGGGAACGGG TATTGTGTTA TTCTCCTCTT TTTTGGGTGC TCCATCTCCT 60



11	12
TTGAAGCTCT ATTTAGTGT CTTGCGAGTA TCTATATCTG CTACAAGTAG CCAGAGGCGT	120
TCTATGCCTT CAATCTGAAG TTCATTTTTT CATCTATGG CGGTATGCTA TTGGTTGAGT	180
ACACACAAAG AACATGGAT AGAGTTTTAT TGTTTACATT ATCAAAAAAC CTTTAACCAA	240
TAAAAAAAT AGCCGCTACC AGAAAAAGT CGCTTAAAT TAATAAGTCT TTTGATTGGT	300
CGCTGTACAT AGAAGTTCAT TTTGGGTGGA CGACAAAAAA ATAAGCGAAT ATCTCAACC	360
AATCAGGATA AACAGCGATA AAACGAAAC GGGGAAGTCA TTAATAAATG GCGGTTAATG	420
TCAACAATGA ACAGTTTGAA AGCATAGAAT TCCAGATTG AATTGAGGGA AACGGAGCAC	480
TACAAAGATG TATAAATACA GGCATTCTGT CCCAGAAGAA AACCAGAATT CGTTCAGTC	540
TTCTATTTTA CATATTCCTT CTTTCTATTT CTTATTCTTC ACTCTACAAG AACTCGCGTT	600
GGGTGTGAAT TTACATCCCT CTGTGCAACA AACCTGCTCC GTTAGCTAAT TTTCTGTAAA	660
TTTGCTTCGA TCTTTCTTAT TCTAATCTTT TAATCCTTTT TCTTTTGAA TTTGCGCTTT	720
TTAAACTCTC CCTTTTTTGG AATCAGTCAA CAAATTATAA TTTTCTTCTT TTATTGCTA	780
GTTCATCGCT TAAACTATCT TTCTTTTCT AACTTATCAA CGAAATTTTA TTTTTCAC	840
ATACATT ATG AAG ATC ACC GCT GTC ATT GCC CTT TTA TTC TCA CTT GCT	889
Met Lys Ile Thr Ala Val Ile Ala Leu Leu Phe Ser Leu Ala	
10	
GCT GCC TCA CCT ATT CCA GTT GCC GAT CCT GGT GTG GTT TCA GTT AGC	937
Ala Ala Ser Pro Ile Pro Val Ala Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser	
20 30	
AAG TCA TAT GCT GAT TTC CTT CGT GTT TAC CAA AGT TGG AAC ACT TTT	985
Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Val Tyr Gln Ser Trp Asn Thr Phe	
40	
GCT AAT CCT GAT AGA CCC AAC TTG AAA AAG CGC GAA TTC GAA GCT GCT	1033
Ala Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu Ala Ala	
50 60	
CCC GCA AAA ACT TAT GCT GAT TTC CTT CGT GCT TAT CAA AGT TGG AAC	1081
Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr Gln Ser Trp Asn	
70	
ACT TTT GTT AAT CCT GAC AGA CCC AAT TTG AAA AAG CGT GAG TTT GAA	1129
Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu Phe Glu	
80 90	
GCT GCC CCA GAG AAG AGT TAT GCT GAT TTC CTT CGT GCT TAC CAT AGT	1177
Ala Ala Pro Glu Lys Ser Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr His Ser	
100 110	
TGG AAC ACT TTT GTT AAT CCT GAC AGA CCC AAC TTG AAA AAG CGC GAA	1225
Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys Arg Glu	
120	
TTC GAA GCT GCT CCC GCA AAA ACT TAT GCT GAT TTC CTT CGT GCT TAC	1273
Phe Glu Ala Ala Pro Ala Lys Thr Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Ala Tyr	
130 140	
CAA AGT TGG AAC ACT TTT GTT AAT CCT GAC AGA CCC AAC TTG AAA AAG	1321
Gln Ser Trp Asn Thr Phe Val Asn Pro Asp Arg Pro Asn Leu Lys Lys	
150	
CGC ACT GAA GAA GAT GAA GAG AAT GAG GAA GAG GAT GAA GAA TAC TAT	1369
Arg Thr Glu Glu Asp Glu Glu Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Tyr Tyr	
160 170	
CGC TTT CTT CAG TTT TAT ATC ATG ACT GTC CCA GAG AAT TCC ACT ATT	1417
Arg Phe Leu Gln Phe Tyr Ile Met Thr Val Pro Glu Asn Ser Thr Ile	
180 190	
ACA GAT GTC AAT ATT ACT GCC AAA TTT GAG AGC TAAACTCATT TTATCTTC	1468

Thr Asp Val Asn Ile Thr Ala Lys Phe Glu Ser

200

ATAITTTTT TATTTCTAG TATGTTAGCC CACACATCTT TACAAAGCCA TGTGAAGCAA 1528

TTTTTAAAT TAATTGCTAT TTTCGATCTA TTATTTTACC ATACGATCTG TATTCCTATT 1588

CGCAATAATA TTTTAAATTT TCATCTTAGT CTTCATATTG TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1648

AAAAAAAAA AAGAAAAAAC GTATAGTAGT TACAATATTA CTGAAATCTA CAGTACT 1705

【図面の簡単な説明】

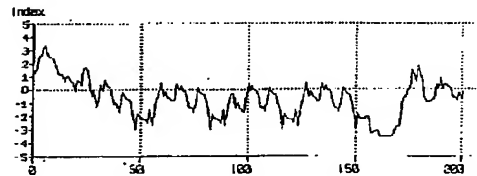
【図1】 map2遺伝子産物に見られる繰り返し構造を示す表

【図2】 map2遺伝子産物の疎水性領域と親水性領域を示すグラフ

【図1】

31- 57: KSYADPLRVYQSWNTFANPDRPNLKKR  
 58- 91: EFPAAPAKTYADFLRAYQSWNTFVNPDPRPNLKKR  
 92-125: EFPAAPERSYADFLRAYHSWNTFVNPDPRPNLKKR  
 126-159: EFPAAPAKTYADFLRAYQSWNTFVNPDPRPNLKKR

【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 21/02

C 8214-4B

(C 1 2 N 15/31

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**